

ZERTIFIKAT - CERTIFICATE



Dartsch Scientific GmbH Institut für zellbiologische Testsysteme

bescheinigt hiermit, dass die nachfolgend aufgeführten aromatisierten E-Liquids

- Vinirette Virginia und American Blend (jeweils nikotinfrei)
- Vinirette Virginia und American Blend (jeweils 15 mg/ml Nikotin)

der Firma

Vinirette Europe UG, D-22041 Hamburg

mit tierversuchsfreien zellbiologischen Testmethoden („in vitro“) auf
akuttoxische Wirkungen untersucht wurden.

Testergebnis

Bei den von uns durchgeführten Untersuchungen wurde das Dampfen der E-Liquids entsprechend dem Rauchen einer Tabakzigarette simuliert. Die Wirkung verschiedener Verdünnungen des erhaltenen Primäreluats wurde an kultivierten humanen Lungenzellen der Zelllinie A-549 getestet. Die gepoolten E-Liquids führten dabei in keiner der getesteten Konzentration zu einem akuttoxischen Effekt. Im Gegensatz dazu bewirkte der Rauch nur einer einzigen Tabakzigarette im gleichen Testsystem bereits bei einer vielfach niedrigeren Konzentration ein ausgeprägtes Absterben der Zellen.

Schongau, den 26. April 2015




Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker

Dartsch Scientific GmbH · Oskar-von-Miller-Str. 10 · D-86956 Schongau

Firma

Vinirette Europe UG

Am Neumarkt 38 a

22041 Hamburg

Oskar-von-Miller-Straße 10
D-86956 Schongau, Germany

Fon Diessen: +49 8807 2759-650

Fon Schongau: +49 8861 256-5250

Fax: +49 8861 256-7162

Email: info@dartsch-scientific.com

Web: www.dartsch-scientific.com

26. April 2015

TESTBERICHT

Akuttoxische Wirkung von Zigarettenrauch im Vergleich zum Dampf aromatisierter E-Liquids der Marke Vinirette – Untersuchungen mit kultivierten Lungenzellen des Menschen –

Hintergrund

Nach den aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnissen sind elektrische Zigaretten eine bei weitem weniger schädliche Alternative zum Zigarettenrauchen. Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Studie die akuttoxische Wirkung von Zigarettenrauch im Vergleich zum Dampf von vier E-Liquids der Firma Vinirette Europe UG, 22041 Hamburg, mit kultivierten Lungenzellen des Menschen untersucht werden.

Verwendete Tabakzigarette und E-Liquids

Die Untersuchungen wurden durchgeführt mit einer verbreiteten Zigarettenmarke mittlerer Stärke mit 10 mg Teer, 0,8 mg Nikotin und 10 mg Kohlenmonoxid. Im Vergleich dazu wurden die vier E-Liquids der Firma Vinirette Europe UG, 22041 Hamburg, in zwei Pools bestehend aus jeweils zwei Einzelliquids mit gleichen Volumenanteilen gemischt und untersucht.

- Pool #1 (nikotinfrei) bestehend aus Virginia und American Blend
- Pool #2 (15 mg/ml Nikotin) bestehend aus Virginia und American Blend

Simulation des Rauchens bzw. Dampfens

Um unter möglichst in vivo-nahen Bedingungen den Rauch bzw. Dampf aufzufangen, wurde eine speziell konstruierte Rauchapparatur verwendet (Abb. 1). Diese gestattet es, die Zugfrequenz und die Dauer und Tiefe der Züge zu variieren. Als Vorlage wurden für das Rauchen von zwei Tabakzigaretten 20 Züge mit jeweils 3 Sekunden Dauer und einer Pau-

se von 15 Sekunden zwischen zwei Zügen angenommen. Siehe hierzu Vansickel AR et al. (2010): A clinical laboratory model for evaluating the acute effects of electronic “cigarettes”: Nicotine delivery profile and cardiovascular and subjective effects. Cancer Epidemiology, Biomarkers, and Prevention 19:1945–1953. Für die E-Zigarette einer handelsüblichen Sorte mit Verdampfer 2,2 Ω und Akku 3,7 V wurden die vergleichbaren Bedingungen eingehalten, d.h. es wurden 20 Züge mit jeweils 5 Sekunden Dauer durchgeführt. Anmerkung: Bei E-Zigaretten wird im Vergleich zur Tabakzigarette weniger stark, aber dafür deutlich langsamer und länger gezogen.

Der Rauch der Tabakzigaretten bzw. Dampf der gepoolten E-Liquids wurde durch eine Schlauchpumpe angesaugt und durch 20 ml des 10 mM HEPES-gepufferten Zellkulturmediums geleitet. Dieses Primäreluat war im Falle der Tabakzigarette braungelb verfärbt; im Falle des Dampfes war keine Verfärbung feststellbar. Für alle Primäreluate wurde keine Abweichung vom neutralen pH-Wert festgestellt. Das Primäreluat wurde mit Porenfiltern (0,45 μm Porengröße) sterilfiltriert und in den im nächsten Abschnitt beschriebenen Verdünnungen bzw. Konzentrationen zu den Lungenzellkulturen gegeben.

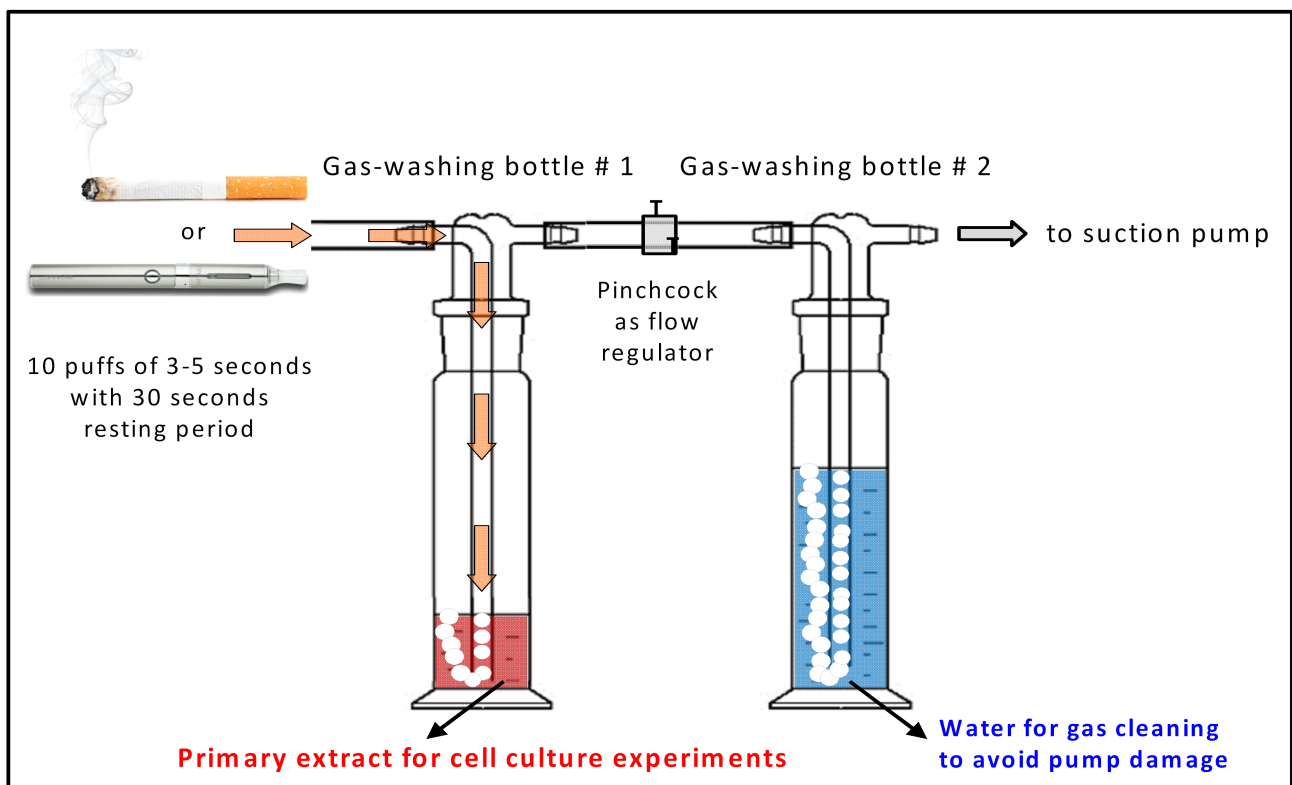


Abb. 1: Versuchsanordnung zur Simulation des Dampfens bzw. Rauchens. Für die zellbiologischen Untersuchungen wird nur das Primäreluat in der linken Gaswaschflasche verwendet, in welcher sich gepuffertes Kulturmedium zur Konstanthaltung des pH-Wertes während des Durchsaugens von E-Liquid-Dampf bzw. Zigarettenrauch befindet.

Versuchsdurchführung

Für die Untersuchungen wurden humane Adenokarzinomzellen des Menschen (Zelllinie A549; European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, UK) verwendet, welche – trotz ihres kanzerogenen Ursprungs – in der aktuellen zellbiologischen Forschung der Lunge häufig eingesetzt werden. Siehe hierzu Cervellati F et al. (2014): Comparative effects between electronic and cigarette smoke in human keratinocytes and epithelial lung cells. *Toxicology in Vitro* 28: 999-1005.

Für die Versuche wurden die Zellen aus 80-90 % konfluenten Massenkulturen in neue 96-Loch-Multiwellplatten (enzymatischer Test der Zellvitalität; 200 µl/Vertiefung) ausgesät. Dabei wurde die Zelldichte so gewählt, dass die Zellen während der gesamten Expositionszeit keine Konfluenz erreichten. Die Zellen wurden in DMEM/Ham's F12 (1:1) mit 10 % fötalem Kälberserum und den üblichen Mengen an Penicillin und Streptomycin kultiviert und in einem Brutschrank bei 37 °C und einer Atmosphäre aus 5 % CO₂ und 95 % Luft für 24 Stunden zum vollständigen Absetzen und Ausbreiten vorinkubiert. Danach wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch eine Mischung aus frischem Kulturmedium und dem Primäreluat vom Zigarettenrauch bzw. E-Liquid-Dampf ersetzt. Dabei betrug die Konzentration des Primäreluats im Test: 0 – 10 – 25 – 50 – 100 Vol% mit 0 Vol% als Kontrolle (= nur Kulturmedium ohne Primäreluat) und 100 Vol% (= unverdünntes Primäreluat). Die Expositionszeit der Zellen betrug 24 Stunden.

Danach wurden die Zellen auf sichtbare Zeichen einer akuttoxischen Wirkung durchmustert, das Kulturmedium abgesaugt und durch 190 µl frisches Kulturmedium und 10 µl des Tetrazoliumfarbstoffes WST-1 (Roche Diagnostics, Mannheim) ersetzt und für 60 min im Brutschrank inkubiert. Das rote Tetrazoliumsalz wird durch die Produktion von NAD(P)H während der Glykolyse metabolisch aktiver Zellen in ein wasserlösliches gelbes Formazan gespalten. Die gebildete Menge an Formazan korreliert dabei direkt mit der metabolischen Aktivität einer Zellpopulation. Die optischen Dichte (= Menge) an gebildetem Formazan kann kolorimetrisch bei einer definierten Wellenlänge gemessen werden. Daher wurde nach der Inkubationszeit von 60 min die optische Dichte als Differenzmessung $\Delta OD = 450$ minus 690 nm in einem Elisareader (BioTek Slx808, Bad Friedrichshall) nach einer 4 Sekunden-Schüttelperiode gemessen. Die erhaltenen Werte wurden aufgezeichnet und statistisch ausgewertet. Die Untersuchungen wurden im dreifachen Versuchsansatz durchgeführt.

Versuchsergebnisse und Schlussfolgerungen

Die morphologischen Veränderungen der Lungenzellen nach der 24stündigen Expositionszeit mit dem Primäreluat vom Zigarettenrauch waren dramatisch und führten zu einem ausgeprägten Abrunden, Ablösen und Absterben der Zellen (nicht abgebildet). Selbst die niedrigste Testkonzentration von 10 Vol% bewirkte bereits einen mehr als 30%igen Vitali-

tätsverlust der Zellen und erreichte beim unverdünnten Primäreluat (= 100 Vol%) sein Maximum mit nur noch 3 % vitalen Zellen.

Ganz anders dagegen bei den Zellen, welche dem Dampf der gepoolten E-Liquids ausgesetzt waren. Hier wurden bei allen Testkonzentrationen keinerlei morphologische Veränderungen der Lungenzellen beobachtet. Auch die enzymatisch bestimmte Zellvitalität nach Exposition mit dem Dampf der gepoolten E-Liquids wich nicht statistisch signifikant von der Kontrolle ab (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; Abb. 2).

Anmerkung: Da die hier durchgeführten Untersuchungen des E-Liquid-Pools keine akuttoxischen Wirkungen zeigten, sind damit auch die in dem jeweiligen Pool enthaltenen Einzelliquids durch die Untersuchungen abgedeckt.

Zusammengefasst hat der Tabakrauch eine vielfach höhere Akuttoxizität als der Dampf des getesteten E-Liquid-Pools resp. der Einzelliquids der Marke Vinirette. Bei den hier durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen konnten für den E-Liquid-Dampf keinerlei akuttoxische Wirkungen bei kultivierten Lungenzellen des Menschen nach 24stündiger kontinuierlicher Einwirkungszeit festgestellt werden.

Versuchsleiter und verantwortlich für die fachgerechte Durchführung und Auswertung der Untersuchungen.

Schongau, den 26. April 2015



Prof. Dr. Peter C. Dartsch
Diplom-Biochemiker

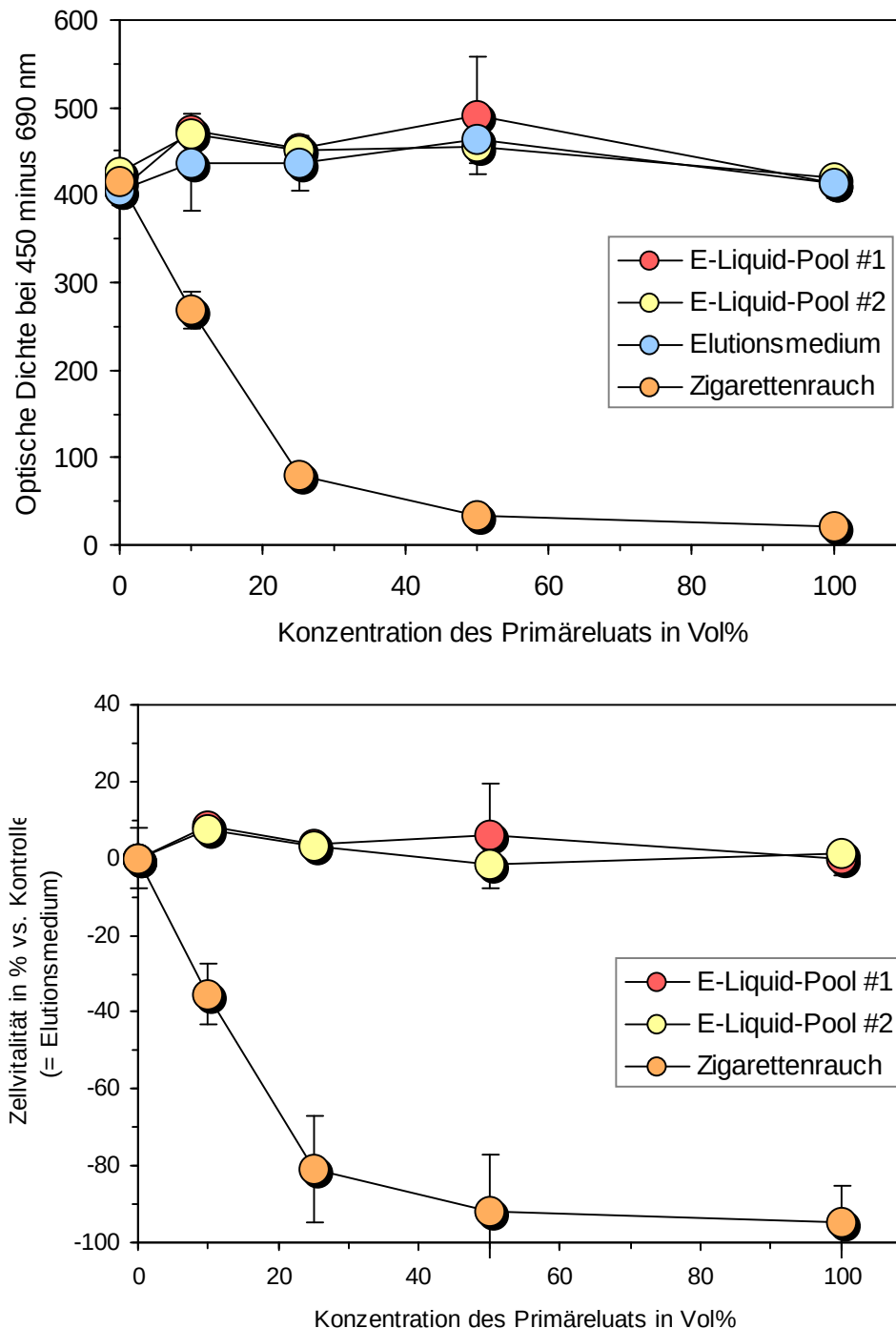


Abb. 2: Graphische Darstellung der Versuchsergebnisse zur akuttoxischen Wirkung von Zigarettenrauch im Vergleich zum Dampf der gepoolten E-Liquids. Während das Primäreluat des Zigarettenrauches bereits bei 10 Vol% zu einem deutlichen Vitalitätsverlust der Lungenzellen führt, ist die Vitalität der Zellen selbst bei 100 Vol% des Dampfes – und damit dem unverdünnten Primäreluat – immer in einem Bereich, der statistisch nicht signifikant vom Kontrollwert abweicht. Angegeben ist der Mittelwert $\pm$ Standardabweichung aus 3 Versuchen.